

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-87814

(43) 公開日 平成5年(1993)4月6日

| | | | | |
|---------------------------|------|----------|-------|--------|
| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I . | 技術表示箇所 |
| G 0 1 N 33/564 | B | 9015-2 J | | |

審査請求 未請求 請求項の数6(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平3-252388

(22) 出願日 平成3年(1991)9月30日

(71) 出願人 000001270

コニカ株式会社

東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

(72) 発明者 葛原 憲康

東京都日野市さくら町1番地 コニカ株式
会社内

(72) 発明者 植嶋 孝夫

東京都日野市さくら町1番地 コニカ株式
会社内

(74) 代理人 弁理士 宇高 克己

(54) 【発明の名称】 リウマチ診断方法及びリウマチ診断薬並びにアガラクト
量方法

シル I g G の定

(57) 【要約】

【目的】 リウマチの診断を正確に行える技術を提案することである。

【構成】 ヒト血清中に存在するアガラクトシル I g G 量を抗ヒト I g G 抗体とレクチンとによりサンドイッチして測定することにより診断するリウマチ診断方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量を抗ヒトIgG抗体とレクチンとによりサンドイッチして測定することにより診断することを特徴とするリウマチ診断方法。

【請求項2】 抗ヒトIgG抗体がFc部位を含まないものであることを特徴とする請求項1のリウマチ診断方法。

【請求項3】 レクチンがリシナスコミニシアグルチニン(RCA)であることを特徴とする請求項1のリウマチ診断方法。

【請求項4】 抗ヒトIgG抗体が担体に固定化され、レクチンが酵素標識されたものであることを特徴とする請求項1のリウマチ診断方法。

【請求項5】 抗ヒトIgG抗体とレクチンとよりなり、ヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量をサンドイッチして測定することを特徴とするリウマチ診断薬。

【請求項6】 ヒトIgGを含む溶液にガラクトース転移酵素とウラシルデオキシヌクレオチドリン酸-ガラクトースを加え、新たに転移したガラクトースの量を測定することを特徴とするアガラクトシルIgGの定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アガラクトシルIgG量を測定することによるリウマチ診断に関するものである。

【0002】

【発明の背景】 慢性関節リウマチ患者の血清中にはリウマチ因子と言われる自己免疫抗体が存在し、これはヒト免疫グロブリンG(IgG)のFc部位を抗原として認識することが知られている。ところで、最近、リウマチ患者の血清中のIgGのFc部位に存在する糖鎖について詳細な分析が加えられ、その結果、該糖鎖は健康人の血清中のIgGのFc部位における糖鎖に比較してガラクトース含有量が有意に減少していることが報告されている。すなわち、健康人血清中のIgGのFc部位における糖部分は互いに構造の異なる複数の糖鎖から構成されており、種類間の存在比率は個体間でほぼ一定であることが明らかにされた。ところが、リウマチ患者の血清中のIgGのFc部位における糖部分を調べて見ると、構造の異なる複数の種類の糖鎖から構成されており、種類間の比率は健康人の場合と同様に個体間でほぼ一定となるが、全体にガラクトースの含有量が著しく減少していることが判明した。さらに具体的に述べると、健康人血清中のIgGのFc部位の糖部分にはガラクトースを各々2分子、1分子及び0分子含む三種類の糖鎖が約2:2:1の比率で存在するが、リウマチ患者血清中のIgGのFc部位の糖部分ではガラクトースを2分子含

2

む種類の糖鎖が著しく減少し、全体にガラクトースを欠損した糖鎖が大幅に増加していることが報告されている。従って、この事実に基づけば、リウマチ患者血清中のIgGのFc部位の糖部分には糖鎖についての構造異常が起きており、この構造異常を把握することが可能となれば、それはリウマチ因子のマーカーとして使用することができる。そして、血清中のIgGのFc部位の糖部分におけるガラクトース欠損を把握する測定がリウマチの診断に有用となるが、この測定を容易とするためには該被測定対象物のモデル物質としてガラクトースを欠損した糖鎖を持つIgG、いわゆるアガラクトシルIgGが用意されることが望まれる。このようなアガラクトシルIgGが用意されると、そのモノクローナル抗体を用意することが出来、これを使用してリウマチの診断をより容易に行うことができるようになる。又、該アガラクトシルIgGを使用して血清中のリウマチ因子を直接測定することにより、リウマチを診断することができる。

【0003】 このような観点に沿っての研究が行われ、ヒトIgGをβ-ガラクトシダーゼによって処理することにより得られ、所定の理化学的性状を有するアガラクトシルIgGが得られたことが報告(特開平3-48700号公報)されている。しかしながら、この提案によるアガラクトシルIgGがニトロセルロース膜に固定化されてなるリウマチ診断薬でリウマチ因子を直接測定する診断では、アガラクトシルIgGとリウマチ因子との反応が充分なものでもなく、診断の正確性の面で問題が残されている。

【0004】

【発明の開示】 本発明の目的は、リウマチの診断を正確に行える技術を提案することである。この本発明の目的は、ヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量を抗ヒトIgG抗体とレクチンとによりサンドイッチして測定することにより診断することを特徴とするリウマチ診断方法によって達成される。

【0005】 又、抗ヒトIgG抗体とレクチンとよりなり、ヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量をサンドイッチして測定することを特徴とするリウマチ診断薬によって達成される。又、ヒトIgGを含む溶液にガラクトース転移酵素とUDP-Gal(ウラシルデオキシヌクレオチドリン酸-ガラクトース)を加え、新たに転移したガラクトースの量を測定することを特徴とするアガラクトシルIgGの定量方法によって達成される。

【0006】 尚、抗ヒトIgG抗体はFc部位を含まないものであることが好ましく、又、レクチンはリシナスコミニシアグルチニン(RCA)であることが好ましく、そして前記のような抗ヒトIgG抗体は担体に固定化され、レクチンは例えば西洋わさびペルオキシダーゼのような酵素で標識されたものが好ましい。すなわち、リウマチ患者では血清中のIgGのFc部位に存在する糖鎖のガラクトース含有量が著しく減少していることが

ら、ウマチ患者血清中のアガラクトシルIgG量を定量することで、リウマチの診断を正確に行えるのである。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の抗ヒトIgG抗体は市販のものを用いることが出来、多孔質の不溶化担体に化学的及び／又は物理的に直接あるいは間接的に結合させることができる。固定化手段については、1976年、講談社発行、千畑一郎ほか2名編「実験と応用 アフィニティクロマトグラフィー」(第1刷)、1975年、講談社発行、山崎 誠ほか2名編「アフィニティクロマトグラフィー」(第1版)を参考にできる。尚、結合反応後、抗ヒトIgG抗体の非特異反応を排除する目的で、測定すべき特異的反応に関与しない蛋白質を担持させることができる。それらの代表的な例としては、哺乳動物及び鳥類の正常血清蛋白質、アルブミン、スキムミルク、乳酸醗酵物、コラーゲン及びそれらの分解物質等が挙げられる。

【0008】抗ヒトIgG抗体が物理的及び／又は化学的に結合される担体は多孔質なものであることが好ましく、このような担体の材料としてはケイ藻土、二酸化チタン、硫酸バリウム、酸化亜鉛、酸化鉛、微結晶セルロース、ケイ砂、ガラス、シリカゲル、架橋デキストリン、架橋ポリアクリルアミド、アガロース、架橋アガロース、ポリスチレン等の各種の合成樹脂が挙げられる。そして、このような素材の多孔質担体であれば、抗ヒトIgG抗体が固定化される一次的な形状は粒子(ビーズ)状、棒状、プレート状、何れのものであっても差し支えない。

【0009】又、本発明で用いられるレクチンは、通常、微粉碎した種実から抽出し、硫酸アンモニウムで沈澱させた後、糖のアフィニティクロマトにより精製して得られる。特に、リシナスコミニシアグルチニン(RCA)はヒバの種実からβ-D-ガラクトースのアフィニティカラムにより得られる。そして、このようなレクチンの標識に使用される標識物質としては酵素、酵素基質、酵素及び酵素前駆体の活性を変化させる物質(酵素阻害物質、補欠分子族、補酵素)、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質などが挙げられるが、ペルオキシダーゼ、特に西洋わさびのペルオキシダーゼが好ましい。そして、標識物質のレクチンへの結合は、当業者間で知られている公知の試薬と方法で行うことができ、例えば石川 栄治、河合 忠、宮井 深 編「酵素免疫測定法(第3版)、医学書院、1987年」や日本臨床病理学会編「臨床病理」臨時増刊特集第53号「臨床検査の為に免疫ノアッセイ技術と応用」、臨床病理刊行会、1983年」などに記載された方法を参考にすることができる。

【0010】上記抗ヒトIgG抗体とレクチンとによりサンドイッチしてヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量を測定するには、次のようにして行われる。す

なわち、担体に固定化した抗ヒトIgG抗体にアガラクトシルIgGを含むリウマチ患者血清中のIgGを反応させ、B/F分離を行った後、標識したレクチン(RCA)を反応させる。これを再びB/F分離した後、標識の信号を適宜な手段により検出する。

【0011】標識に起因した信号は、吸光度法(比色法)、蛍光法または発光法で検出することができ、測定法としては信号の経時的変化を測定するレート測定法または一定時間後の信号を測定するエンドポイント測定法で測定することができる。そして、このようにして測定されたヒト血清中に存在するアガラクトシルIgG量のデータより、リウマチ患者であるか否かが判定される。具体的には、アガラクトシルIgG量が全IgG量に比較して多い場合にはリウマチ患者であり、アガラクトシルIgG量が全IgG量に比較して少ない場合にはリウマチ患者でないと判定される。

【0012】

【実施例】以下、本発明について具体的に説明するが、本発明はこれによって制限されるものではない。

【実施例1】ヒトIgG(35mg/ml)を0.1Mのクエン酸緩衝液(pH5.5)1ml中でシアリダーゼ(0.5mg/ml)処理した後、β-ガラクトシダーゼ(200mU/ml)と十分に反応させ、その後1.5Mのグリシン-HCl、3MのNaCl(pH8.9)の緩衝液で平衡化されたプロテインA-セファロースCL-4Bに添加した。1.5Mのグリシン-HCl、3MのNaCl(pH8.9)の緩衝液で十分に洗浄した後、0.1Mのグリシン-HCl(pH3.0)でアガラクトシルIgG試料を回収し、リン酸緩衝液で透析した。

【0013】次に、ヒトIgGと上記のようにして得られたアガラクトシルIgGを0:10、1:9、3:7、5:5、7:3、9:1、10:0の割合で混合し、1%BSA-PBS溶液で希釈して、ヒトIgGとアガラクトシルIgGの総量の最終濃度を50μg/mlとした。次に、ヤギ由来抗ヒトIgG・F(ab')₂(ロックランド社)をPBSで希釈して10μg/mlとし、96穴イムノプレートに100μlずつ分注し、4℃で一晩、物理吸着させた。吸着後、液を捨て、PBSで洗浄した後、1%BSA-PBS溶液を200μlずつ加えて1時間ブロッキングした。液を捨てた後、100倍に希釈した。そして、このヒトIgG溶液をPBSで100倍に希釈して100μlずつ加え、37℃で1時間反応させた。反応終了後、液を捨て、PBSで洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識したRCA・HRP(E.Y.ラボラトリーズ)と1%BSA-PBS溶液を加え、室温で1時間反応させた。又、RCA・HRPに代えて抗ヒトIgG・HRPと1%BSA-PBS溶液を加え、同様に室温で反応させた。PBSで洗浄後、0.02%H₂O₂と3mg/

5

mlの α -フェニレンジアミン溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を100 μ lずつ加えて発色させた後、9NのH₂SO₄を50 μ lずつ添加し、反応を停止し、各ウェルにおける492nmの吸光度を測定したので、その結果を図1に示す。これによれば、アガラクトシルIgG量が少なくなるにつれて、レクチンとの反応が増加し、吸光度は増し、検量線を作成できる。

【0014】次に、リウマチ患者の血清12例、健常人の血清11例について、上記と同様にして測定した。すなわち、ヒトIgG溶液に代えて各々1%BSA-PBS溶液で2万倍に希釈したリウマチ患者血清及び健常人血清を各々100 μ l添加し、同様に行った。測定結果は図2に示す通りであり、IgG総量は略同じであるものの、図1の検量線にも一致する通り、アガラクトシルIgG量の差に基づき、抗ヒトIgG抗体とレクチンによりサンドイッチして測定したリウマチ患者の吸光度O.D.は健常人の吸光度O.D.に比べて格段に低く、この差からリウマチ患者であるか否かを判定出来るのである。

【0015】【実施例2】

〔抗IgGポリクローナル抗体F(a b')₂のゲルへの結合〕カルボジイミドで活性化したトリスアクリルゲルGF-2000(ピアス化学社)を蒸留水と結合バッファー(0.1Mホウ酸塩溶液、pH8.5)で2回洗浄する。抗ヒトIgGポリクローナル抗体F(a b')₂ 4mgに結合バッファー2mlと洗浄したGF-2000ゲルを入れ、4℃で一晩振盪培養する。ゲルの未反応活性基は5%BSA/結合バッファー2mlと4℃で一晩培養してブロックする。抗体の結合したゲルを0.1Mクエン酸バッファー、1.4M塩化ナトリウム(pH4.0)と0.1M炭酸バッファー、1.4M塩化ナ

6

トリウム(pH11.0)で交互に洗浄し、最後にPBSで洗浄する。ゲルは5mlのPBS(0.05%NaN₃を含む)中で保存した。

【0016】〔GalTとの反応〕50 μ lの抗IgG抗体が結合したゲル懸濁液と、ヒトIgGを β -ガラクトシダーゼで処理することによって得られたアガラクトシルIgG(20, 10, 5, 1, 0.5 μ g)とを合わせて4℃で一晩振盪培養した。2mlの冷CKTバッファー(20mMのカコジル酸ナトリウム、150mMのKCl、0.01%のトライトンX-100)で3回洗浄した後、上澄液を吸引する。100 μ lのGalT反応液(5 μ lの0.5mM [³H]UDP-Gal液、ニューイングランドヌクレアー社製)、1 μ lの1.0M二酸化マンガン液、94 μ lのCKTバッファー、1.0Uの牛由来ガラクトース転移酵素(シグマ社製)を加え、37℃で30分間インキュベートする。反応終了後、0.05%ツイーン-20を含むPBS溶液2mlで5回洗浄した後、最後に200 μ lのPBSに懸濁した。ゲル懸濁液から100 μ lを取り出し、液体シンチレーターに懸濁後放射活性の測定を行ったので、その結果を図3に示す。

【0017】これによれば、アガラクトシルIgGの定量が可能なが判る。

【0018】

【効果】リウマチの診断を正確に行える。

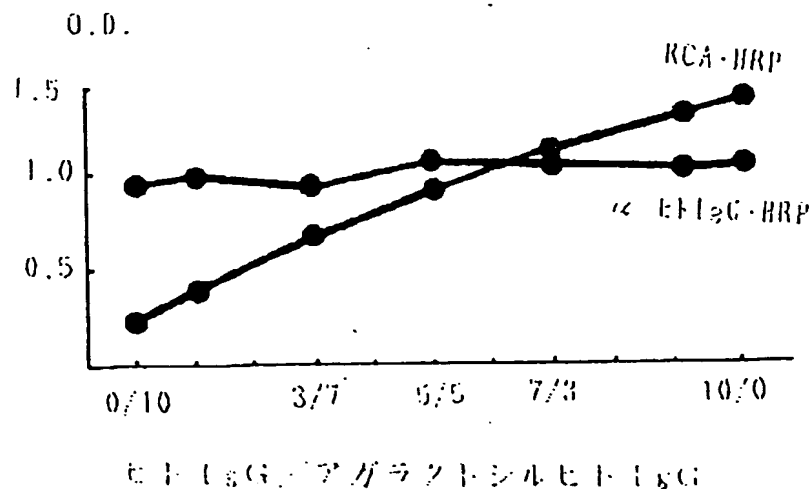
【図面の簡単な説明】

【図1】横軸にヒトIgG/アガラクトシルヒトIgG量を、縦軸に吸光度を示すグラフ。

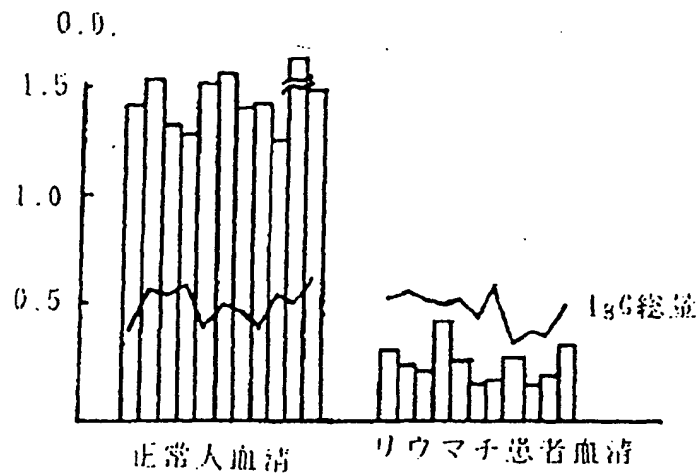
【図2】リウマチ患者血清と健常人血清の吸光度を示すグラフ。

【図3】アガラクトシルIgGの定量を示すグラフ。

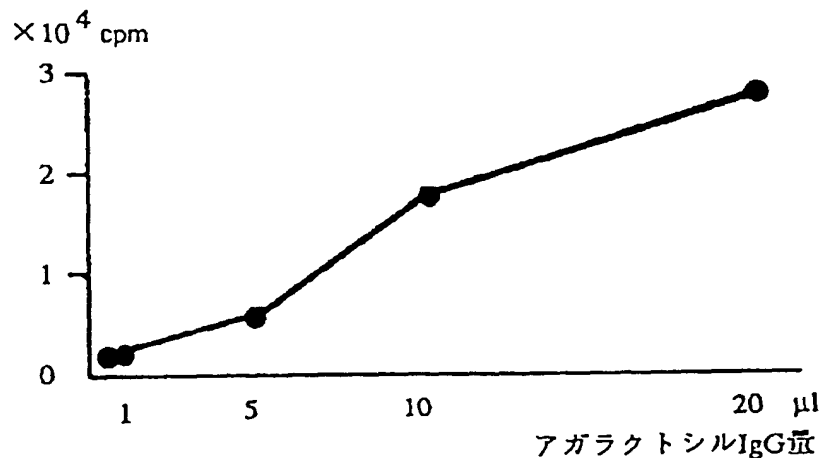
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成3年12月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項6

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項6】 ヒトIgGを含む溶液にガラクトース転移酵素とウリジン5'-ニリン酸-ガラクトースを加え、新たに転移したガラクトースの量を測定することを特徴とするアガラクトシルIgGの定量方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】又、抗ヒトIgG抗体とレクチンとよりなり、ヒト血液中に存在するアガラクトシルIgG量をサンドイッチして測定することを特徴とするリウマチ診断薬によって達成される。又、ヒトIgGを含む溶液にガラクトース転移酵素とUDP-Gal（ウリジン-5'-ニリン酸-ガラクトース）を加え、新たに転移したガラクトースの量を測定することを特徴とするアガラクトシルIgGの定量方法によって達成される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】次に、ヒトIgGと上記のようにして得られたアガラクトシルIgGを0:10、1:9、3:7、5:5、7:3、9:1、10:0の割合で混合し、1%BSA-PBS溶液で希釈して、ヒトIgGとアガラクトシルIgGの総量の最終濃度を $5.0\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。次に、ヤギ由来抗ヒトIgG-F(ab')₂（ロックランド社）をPBSで希釈して $10\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、96穴イムノプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、4℃で一晩、物理吸着させた。吸着後、液を捨て、PBSで洗浄した後、1%BSA-PBS溶液を $200\mu\text{l}$ ずつ加えて1時間ブロッキングした。液を捨てた後、上記のIgG溶液をPBSで100倍に希釈して $100\mu\text{l}$ ずつ加え、37℃で1時間反応させた。反応終了後、液を捨て、PBSで洗浄し、西洋ワサビペルオキ

シダーゼで(HRP)標識したRCA・HRP (E. Y. ラボラトリーズ)と1%BSA-PBS溶液を加え、室温で1時間反応させた。又、RCA・HRPに代えて抗ヒトIgG・HRPと1%BSA-PBS溶液を加え、同様に室温で反応させた。PBSで洗浄後、0.02% H_2O_2 と3mg/mlの α -フェニレンジアミン溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を $100\mu\text{l}$ ずつ加えて発色させた後、9Nの H_2SO_4 を $50\mu\text{l}$ ずつ添加し、反応を停止し、各ウェルにおける492nmの吸光度を測定したので、その結果を図1に示す。これによれば、アガラクトシルIgG量が少なくなるにつれて、レクチンとの反応が増加し、吸光度は増し、検量線を作成できる。